

## 原核重组蛋白抗原制备

### 重组蛋白基因的获取

原核表达必须先获取基因，通常有以下几个途径：

从物种mRNA提取反转录到cDNA模板，通过引物特异性扩增获取。

直接从质粒或提取的基因组扩增获取。

基因合成：不易获取或者需要密码子优化的基因可以考虑基因合成。

### 从mRNA获取基因

#### 哺乳动物组织/细胞mRNA的获取

#### SOP01 动物组织及细胞mRNA的提取制备

##### 1.准备工作

(1)新鲜标本/-80℃冻存样本/液氮储存的标本（保证样品mRNA不降解）。

(2)购买无RNA酶耗材/器材或器材（匀浆器，离心管及枪头）作RNA酶清除处理：

①0.1%的DEPC水浸泡过夜后用蒸馏水清洗，126℃灭菌30min。

或②用蒸馏水浸泡清洗，灭菌三次。

##### 2A.动物组织mRNA提取

(1)将组织样本转入匀浆器中，每100mg组织样本加入1ml Trizol提取液，磨匀至无块状物【匀浆液】。

##### 2B.单层贴壁细胞mRNA提取

(1)吸尽培养液后，每5~10×10<sup>6</sup>个细胞加入1ml的 Trizol，室温放置5~10min，每隔2min晃动一次裂解细胞。

##### 2C.悬浮生长细胞mRNA提取

(1)离心沉淀细胞，每5~10×10<sup>6</sup>个细胞加1ml的Trizol，反应用枪吹打或剧烈震荡以裂解细胞。

##### 注意事项：

1.加Trizol前避免洗涤细胞而增加mRNA降解的可能性。

2.细胞充分裂解无团块。

(2)将匀浆液转移至离心管中，室温放置5min。

3.按匀浆液/氯仿=5:1的体积比加入氯仿，剧烈震荡15s后室温放置5min。

4.12,000rpm，4℃离心15min，吸取水相上清至新离心管中，加入等体积预冷的异丙醇，充分混匀后置-20℃ 1~2h或室温0.5h。

5.12,000rpm，4℃离心10min弃上清，管底沉淀为RNA。

6.加入0.5~1ml 75%乙醇重悬洗涤RNA，12,000rpm离心5min。

7.小心吸净液体，加入50μl ddH<sub>2</sub>O，55℃ 5~10min即可完全溶解。

8. RNA保存于-80℃备用。

货号	产品名称	规格	产品描述
NER0010	Frdbio® ZOL 总 RNA 提取试剂	30ml/100ml	提取的RNA纯度高、得率高，稳定性好。
NER0010K	Frdbio® ZOL 总 RNA 提取试剂盒	50T/100T	
NER0013K	Frdbio® Simply P总 RNA 提取试剂盒	50T/100T	采用中性裂解液，利用高分子膜材料选择性吸附RNA，通过离心柱提取方法，保证了RNA的纯度、得率和稳定性，不受操作者熟练程度的影响。
NER0013KS	Frdbio® Smart总 RNA 提取试剂盒	50T/100T	1min内快速裂解动植物标本，不需使用液氮研磨以及苯酚氯仿等有毒试剂。
NER0031K	Frdbio®病毒RNA 提取试剂盒	50T/100T	提取的RNA纯度高、得率高，稳定性好；操作简单。
NER0030K	Frdbio®病毒 RNA 纯化试剂盒	50T	

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773； ✉ tech@friendbio.com

### 植物组织/细胞RNA提取

植物组织富含的酚类化合物、多糖及高活性RNase会与RNA相互作用：酚类化合物被氧化后与RNA不可逆地结合，导致RNA活性丧失及在后续抽提时RNA的丢失，或形成不溶性复合物；而多糖会形成难溶的胶状物，与RNA共沉淀；酚类化合物和RNase会造成RNA的化学降解和酶解。因此常规的RNA提取方法(如胍法、苯酚法和十六烷基三甲基溴化胺法等)难以对所有的RNA提取都能奏效，常导致以下三种情况：提出的RNA已被降解；RNA的得率很低；得到的RNA不能进行体外反转。

针对以上问题，福因德生物通过优化配方和实验流程，推出了适合于不同需求的植物RNA提取试剂：Frdbio® ZOL植物总RNA提取试剂主要针对常规植物的RNA提取；Frdbio®多糖多酚植物总RNA提取试剂盒通过独特的裂解液/ $\beta$ -巯基乙醇迅速裂解细胞和灭活RNA酶，助提剂快速结合多糖多酚物质并通过离心去除，RNA在高盐状态下吸附于离心柱内硅基质膜上，漂洗离心去除细胞代谢物、蛋白等杂质，低盐溶液从硅基质膜上将RNA洗脱；最后通过DNase I消化DNA得到无DNA残留的高质量RNA。

货号	产品名称	包装/规格	产品特点
NER0020	Frdbio® ZOL植物总RNA提取试剂	30ml/100ml	针对常规植物RNA提取
NER0021K	Frdbio®多糖多酚植物总RNA提取试剂盒	50T	针对多糖多酚植物RNA提取

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773； ✉ tech@friendbio.com

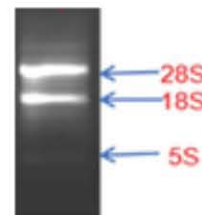
### RNA质量检测及保存

纯度检测：

$R = OD_{260} / OD_{280} = 1.8 \sim 2.1$  (质控点：  $R < 1.8$  蛋白污染,  $R > 2.2$ , RNA降解, 理想的  $R = 2.0$ , 含Tris溶液  $R$  偏高, 但不超过2.2)。

完整性检测：

检测方法琼脂糖凝胶电泳。质量较高的RNA，电泳显示有三条带，并且28s是18s的两倍，5s很弱。



mRNA非常容易降解，是该领域一个棘手问题也是个难题。针对这个问题福因德生物开发出专用的RNA保存试剂。

货号	产品名称	包装/规格	产品特点
NER0001	Frdbio® RNAsafeguard 保存试剂	120ml	长期稳定保存RNA

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773； ✉ tech@friendbio.com

### mRNA反转录/DNA的合成

#### SOP02 mRNA反转录/cDNA的合成

1.去DNA: 反应体系: DNase I 0.2 $\mu$ l, 10  $\times$  DNase Buffer 0.8 $\mu$ l, RNA溶液 7 $\mu$ l; 反应程序: 37 $^{\circ}$ C, 30min; 70 $^{\circ}$ C, 10min。

2.RNA的变性: 反应体系: Oligo dT/Random Primer 1 $\mu$ l, dNTP Mix 1 $\mu$ l, 去DNA后的RNA 8 $\mu$ l; 反应程序: 65 $^{\circ}$ C, 5min, 冰上迅速冷却。

3.cDNA的合成: 反应体系: 变性后的RNA 10 $\mu$ l, 5  $\times$  primescript Buffer 4 $\mu$ l, RNase Inhibitor 0.5 $\mu$ l, Primescript RTase 1 $\mu$ l, RNase-free H<sub>2</sub>O 4.5 $\mu$ l; 反应程序: 42 $^{\circ}$ C, 40~60min, 70 $^{\circ}$ C, 15min。

4.合成后的cDNA -20 $^{\circ}$ C保存备用。

货号	产品名称	包装/规格	产品特点
PCR0050K	Frdbio® RT cDNA 第一链合成试剂盒	100T	采用高质量逆转录酶, 可扩增长达12kb高产量cDNA
PCR0051K	Frdbio® RT 逆转录扩增(RT-PCR)试剂盒(两步法)	100T	
PCR0054K	Frdbio® RT 逆转录扩增(RT-PCR)试剂盒(一步法)	100T	

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773； ✉ tech@friendbio.com

## 从基因组获取基因

基因组DNA要比RNA稳定得多，如果想要表达的基因CDS区段在某个基因组上,我们直接提取基因组DNA即可，有时候甚至不需要提取直接用特异性引物就可以扩增出目标条带；基因组提取的难点是样品的复杂性，福因德生物推出针对不同标本类型特点的提取试剂盒（见下表），本节就不再赘述。

货号	产品名称	包装/规格	货号	产品名称	包装/规格
NEG0001	Frdbio® ZOL 基因组 DNA 提取试剂	30ml/120ml	NEG0070K	Frdbio® 口腔拭子DNA 提取试剂盒	50T/100T
NEG0002K	Frdbio® spin 组织基因组 DNA 提取试剂盒	50T/100T	NEG0080K	Frdbio® 全血基因组DNA提取试剂盒	50T/100T
NEG0003K	Frdbio® 通用基因组 DNA 纯化试剂盒	50T/100T	NEG0081K	Frdbio® 全血基因组 DNA 纯化试剂盒	50T/100T
NEG0030K	Frdbio® 土壤基因组 DNA提取试剂盒	50T	NEG0090K	Frdbio® 石蜡包埋组织基因组DNA提取试剂盒	50T/100T
NEG0040K	Frdbio® 植物基因组 DNA 纯化试剂盒	50T/100T	NEG0101K	Frdbio® 病毒 DNA 纯化试剂盒	100T
NEG0041K	Frdbio® 植物基因组 DNA 提取试剂盒	50T	NEG0110K	Frdbio® spin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒	50T/100T
NEG0051K	Frdbio® spin细胞基因组DNA提取试剂盒	50T/100T	NEG0120K	Frdbio® spin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒	50T/100T
NEG0060K	Frdbio® 海洋动物基因组DNA提取试剂盒	50T/100T	NEG0140K	Frdbio® 昆虫基因组DNA 提取试剂盒	50T/100T

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773； ✉ tech@friendbio.com

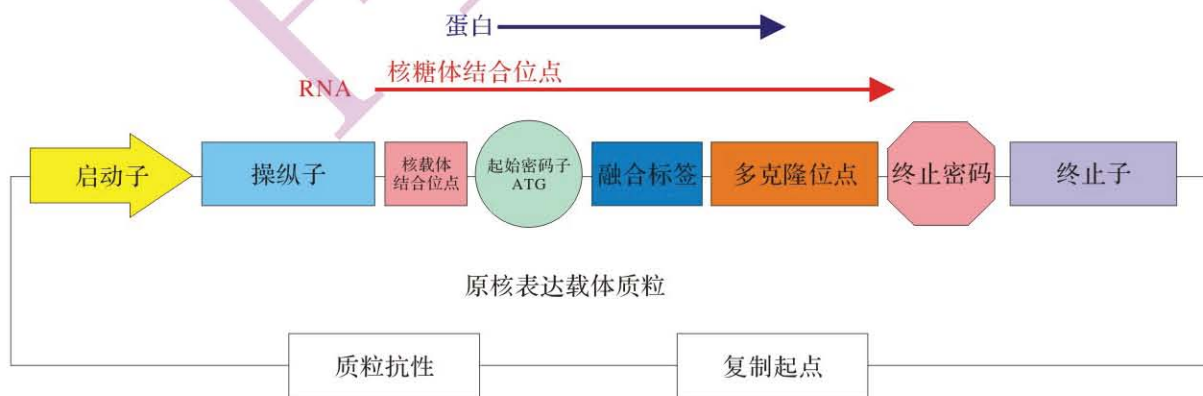
## 全基因合成获取基因

对于难以获取的基因，可以通过NCBI查询其序列通过全基因合成获取其序列，作为表达的基因可以在不改变氨基酸序列的情况下进行密码子优化更利于表达

## 原核表达载体构建

### 原核表达载体选择

质粒载体是重组蛋白表达的关键工具，其结构如下图。重组蛋白表达，我们首先要将基因插入到表达载体上，插入的位置为多克隆位点。质粒载体上有很多的功能元件，这些元件对于蛋白的表达都是至关重要的。尽管我们经过系统的分析和预测，但是仍有很多蛋白不能顺利表达、表达量很低或者表达状态不好。这个时候我们需要尝试构建不同的表达载体以期得到最好的效果，这些载体的主要区别是启动子和融合标签的差异。



蛋白表达优化主要工作就是尝试构建不同融合表达标签、使用不同的宿主表达菌、测试不同的表达条件，筛选出最优表达体系。常用的融合标签有GST、MBP、Trx、6His、SUMO等，这些标签主要功能是促表达、促可溶、信号标记或助纯化。福因德生物可以提供以下系列载体以供科研表达研究。

促表达/促溶标签

标签名称	结构	主要功能	Frdbio相关产品
GST标签(谷胱甘肽-S-转移酶)	211aa	增加外源蛋白的可溶性表达; 提高蛋白表达量。	Frdbio® pFrd-GST1质粒 Frdbio® pFrd-GST2质粒
MBP标签(麦芽糖结合蛋白标签)	396aa	增加在细菌中过量表达的融合蛋白表达的溶解性, 尤其是真核蛋白	Frdbio® pFrd-MBP质粒
SUMO(小分子泛素样修饰蛋白)	98aa	分子伴侣, 提高融合蛋白的表达量, 且具有抗蛋白酶水解以及促进靶蛋白正确折叠, 提高重组蛋白可溶性。	Frdbio® pFrd-SUMO质粒
NusA(氮素利用物质A)	495aa	促进重组表达蛋白的可溶性。	Frdbio® pFrd-NusA质粒
Trx(硫氧还原蛋白)	109aa	促二硫键正确配对, 促进蛋白可溶性表达。	Frdbio® pFrd-Trx质粒
GB1(Protein G核心结构B1)	56aa	促进表达蛋白的可溶性。	Frdbio® pFrd-GB1质粒

信号标记标签

标签名称	结构	标签功能	Frdbio相关产品
Halo标签	300aa	脱卤素酶的遗传修饰衍生物。	Frdbio® pFrd-Halo质粒
AVI标签	15aa	标签小不影响空间结构; 重组蛋白被生物素连接酶生物素化, 实现体内氧化温和标记。	Frdbio® pFrd-Avi质粒
SNAP标签	182aa	多种环境下的蛋白质检测与纯化, 如活细胞内、溶液中、或固态相(如SDS-PAGE gels)等。SNAP-Tag都能与底物高特异性地共价结合, 使蛋白标记上生物素或荧光基团(如荧光素和若丹明)。标记物可以深入细胞, 适合细胞标记。	Frdbio® pFrd-SNAP质粒

我们选择表达载体的时候不但要考虑蛋白成功表达, 更要考虑蛋白纯化问题, 纯化的问题主要是考虑纯化标签和酶切位点的选择, 下表我们列举了常见的纯化标签和酶切位点。

纯化标签

标签名称	标签结构	纯化配体	Frdbio相关产品
组氨酸标签 (His-Tag)	6-10aa (His)	固化金属离子: 镍、钴、铜、锌	Frdbio® Ni NTA Beads Frdbio® Co NTA Beads Frdbio® Cu IDA Beads Frdbio® Zn IDA Beads
GST标签 (谷胱甘肽-S-转移酶)	211aa	谷胱甘肽树脂	Frdbio® Glutathione Beads
FLAG标签	8aa(DYKDDDDK)	抗FLAG单抗	Frdbio® Anti-Flag单抗 Frdbio® Anti-Flag Affinity Beads
Strep-II标签	8aa(WSHPQFEK)	Strep Tactin	Frdbio® Streptactin Beads
Protein A(葡萄球菌A标签)	280aa	固相IgG	Frdbio® IgG Beads
MBP标签(麦芽糖结合蛋白标签)	396aa	交联直链淀粉	Frdbio® Dextrin Beads
CBP(钙调素结合蛋白标签)	26aa	固相钙调蛋白	Frdbio® Streptactin Beads
CBD(几丁质结合结构域蛋白)	51aa	几丁质	Chitin Beads
Halo标签(33KDa)	300aa	氯化烷烃	HaloLink Beads

酶切位点

酶切位点	切割位点	Frdbio相关产品
Thrombin	Leu-Val-Pro-Arg▼Gly-Ser	—
Factor Xa	Ile-Glu/Asp-Gly-Arg▼	—
Enterokinase(肠激酶)	Asp-Asp-Asp-Asp-Lys▼	—
TEV protease	Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln▼Gly	Frdbio® TEV protease
PreScission( HRV 3C Protease)	Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln▼Gly-Pro	Frdbio® 3C Protease
SUMO Protease	recognize the tertiary structure of the ubiquitin-like (UBL) protein, SUMO	Frdbio® ULP Protease

科研工作者可根据具体实验设计方案, 组合设计以上标签和酶切位点的使用。选用和设计蛋白酶切位点的时候首要考虑的是序列内部有没有蛋白酶位点, 同时要考虑酶切的效率和蛋白酶试剂成本。一般商业化载体, 在标签蛋白与载体多克隆位点之间都设计有酶切位点。

标签可设计在N-端也可在C-端, 设计在N-端的优势是, 可通过标签高效翻译起始位点带动插入蛋白的表达, 可溶性标签的表达也可促进蛋白的可溶性表达; 同时, 大部分的蛋白内切酶的切割位点在C-端, 所以标签设计在N-端可将融合标签切割完全。

在设计标签序列与酶切位点的时候还要考虑N-端稳定性原则, 也就是所谓宿主细胞的N-端规则 (N-end rule)。

## 基因克隆

长片段基因在大肠杆菌中表达往往比较困难，作为抗原使用的重组蛋白可以考虑选择抗原性好的区段截短原核表达，前文已作阐述，如需对整个蛋白结构进行研究，必须全长表达该蛋白，此时可考虑真核表达系统，特别是含有跨膜区的蛋白。

选定要克隆的区段，需先富集纯化之后方可插入载体，常用的富集方法是PCR或者质粒繁殖复制。为了防止在PCR扩增过程中引入碱基错误或者碱基缺失，PCR扩增基因时候必须使用高保真Taq酶。为了满足科研工作者不同实验需求，福因德生物将高保真Taq酶优化为即用型Mix，使用时直接加引物和模板就可以扩增。除此之外，福因德生物还开发出LA Taq、S-Taq Mix 以及SYBR荧光定量PCR Mix(需要更高质量的可选用SYBR PCR SuperMix)。

货号	产品名称	规格	产品特点
PCR0020	Frdbio® LA Taq	250U/500U	针对长片段扩增
PCR0031	Frdbio® 2 × S-Taq Mix	1000µl	针对高GC含量模板
PCR0032	Frdbio® Taq Mix	1000µl	扩增效率高，适用于普通检测
PCR0053S	Frdbio® 2 × SYBR Green PCR Super Mix	1250µl	超级荧光定量PCR Mix
PCR0053	Frdbio® 2 × SYBR Green PCR Mix	1250µl	荧光定量PCR Mix
PCR0052K	Frdbio® RT 实时荧光 RT-PCR 试剂盒	50T/100T	RT荧光定量PCR试剂盒
PCR0053K	Frdbio® SYBR Green I Real Time PCR Kit	100T/200T	荧光定量PCR试剂盒

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ [tech@friendbio.com](mailto:tech@friendbio.com)

## 载体构建策略的选择

原核重组表达常用载体构建策略主要有以下几种：

### 酶切连接

这个是目前应用最为广泛的的克隆技术，主要优点是技术稳定；缺点是周期长、步骤多，任何一个环节产生的误差都会影响克隆构建的成败。如用酶切连接的策略进行载体批量构建，不同载体和不同外源基因因尽可能选用相同的上下游酶切位点，比如，批量克隆基因到某个载体上，可一次性大量双酶切将载体线性化后保存备用，每次构建载体只需酶切外源基因片段，载体可直接取用，不必每次都酶切，省时省力（此处需特别留意的是基因内部不能有与上述相同的酶切位点）。

### TA克隆

TA克隆必须使用商业的线性化载体，线性载体3'末端有一个T碱基，与PCR扩增产物3'末端A正好匹配。这种克隆策略最大的优点是载体使用方便，扩增产物可以直接克隆到载体上，不需要酶切位点等冗余序列。缺点是：必须依赖商业化载体，载体选择受限；扩增外源片段所使用的Taq酶也必须是可以在3'末端加A，这种Taq酶的保真度不高；外源片段插入之后还必须鉴定方向。目前，这种构建表达载体的策略已经逐渐被淘汰。

### TOPO克隆

TOPO克隆载体利用DNA拓扑异构酶I识别序列中的CCCTT松弛双螺旋并重新连接，同时兼具限制性内切酶和连接酶的功能。主要原理是在T载体的T碱基上共价偶联一个DNA拓扑异构酶I分子，其克隆效率提高数倍，并且操作极其简单，整个反应体系不需要在添加连接酶成分。如果在线性化平端载体上共价偶联一个DNA拓扑异构酶I分子，平端连接将不再是难题，如果再配合一个致死基因ccdB（Control of cell death）使用，凡是没有插入外源核酸序列的空载体自连，转入大肠杆菌可以正常表达ccdB蛋白，破坏细菌DNA gyrase(促旋酶)，造成细菌染色体降解而死亡；而插入外源核酸序列的会干扰ccdB蛋白的正常表达，细菌可以正常存活，平端克隆高背景问题这样得以完美解决。

### Gateway技术

该技术所依赖的基础是lambda噬菌体的位点特异性重组反应。该方法一步就可以完成，只需要将基因克隆到入门载体（Entry Vector），依赖载体上的特定的重组序列和重组酶，将外源基因克隆到具有相同重组序列的载体上；入门载体一般包含两个attL1和attL2，中间夹杂一个ccdB自杀基因，自连的空载体在转入大肠杆菌中都不会存活。入门载体构建成功之后，就可以轻松地将入门载体和目的载体质粒混合加入重组酶即可发生重组，生成所需要的融合质粒，当然还有一个副产品质量粒。这种克隆方法适合于将一个基因批量化构建到不同载体系列中进行功能测试。这种技术也适合于大批量的文库构建，具体细节在此就不做赘述。

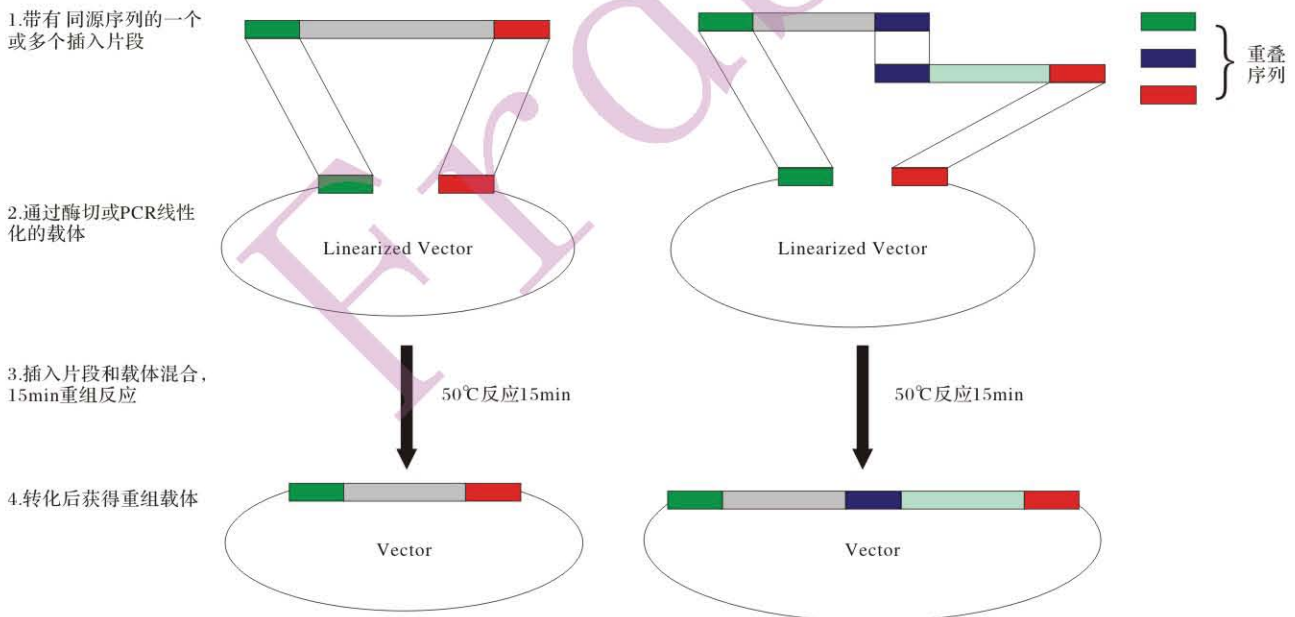
该技术主要的缺点是：该技术系统使用的酶非常昂贵，而且酶非常不稳定；其次，适合于gateway技术的载体非常少，只有一个厂家生产而且昂贵，来源受限；对于大片段（>10Kb）的效率很低，与传统的酶切-T4连接技术相比没有优势。

### Infusion技术

这个是目前比较流行的克隆技术，可以任意载体任意基因片段快速实现多片段、长片段定点定向克隆，最大的优点在于不依赖于酶切位点进行克隆，操作时间也非常短，只需要10~15min；但其缺点是载体和外源片段连接处的重叠15bp必须坚持末端原则，不能“甩出”，这也限制了定点克隆的“任意发挥”。

### Frdbio SimpleClone技术

本克隆技术是在福因德生物基础团队在Infusion技术上的升级，除了兼具Infusion技术的全部优势外，还具有以下特点：克隆片段重叠区可以少于15bp，最短可以至10bp，反应温度50℃，载体线性化之后，重叠区可不必末端对齐，可以“允许末端甩出”，实现真正意义上的任意位点克隆。



货号	产品名称	包装/规格
MLG0020K	Frdbio® Simple克隆试剂盒	10T/50T/100T
MLG0020	Frdbio® Simple酶克隆试剂	10T/50T/100T

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

### SOP03 酶切连接法构建载体

1.50 μl酶切体系: PCR回收产物/载体 ~ 2μg, 限制性内切酶 A 1μl (10U), 限制性内切酶 B 1μl (10U), 双酶切 Buffer 5μl, H<sub>2</sub>O补充至50μl; 37℃ 酶切4 ~ 6h。

2.10 μl连接体系: 酶切PCR回收产物与酶切线性化载体摩尔比为10:1, Ligase 0.5μl, 10\*Ligase Buffer 1μl, H<sub>2</sub>O补足至10μl(体系中线性化载体浓度不低于10ng/μl), 16℃ 连接过夜。

3.连接产物可直接用于转化大肠杆菌。

### SOP04 Simpleclone重组酶法构建载体

#### 1.载体线性化:

载体线性化同上文“SOP3酶切连接法构建载体”。

2.外源片段的获得: 参照Simpleclone重组酶说明书设计引物并扩增获得, 保证两端分别与线性化载体末端有15nt重叠区。

#### 3.反应体系的配制(10μl):

实验组: 线性化载体 50ng, 外源插入片段50ng, 5 × Simpleclone重组连接反应液 2μl, 补足水至10μl;

阴性对照组: 线性化载体 50ng, 外源插入片段50ng, 补足水至10μl;

阳性对照组: 线性化载体pUC19 Control Vector 20 ng, 外源插入片段2 kb Control Insert fragment 50ng, 5 × Simpleclone重组连接反应液 2μl, 补足水至10 μl ;

4.将以上体系配置好在PCR管底部(阴性对照和阳性对照实验可选做), 配好后放在PCR仪上或水浴锅中50℃ 15min。

5.连接产物可直接用于转化大肠杆菌。

## 重组质粒的筛选鉴定

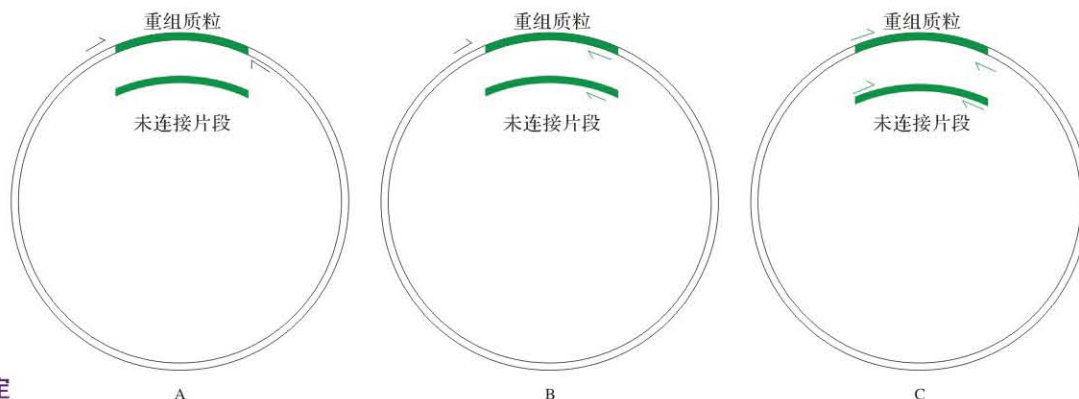
外源片段插入质粒载体之后,必须经过筛选鉴定才能确认外源基因插入是否与当初设计的方案一致。常用的筛选方法有蓝白斑筛选、酶切、PCR鉴定等,最终通过测序确认;表达载体的构建,必须保证插入序列完全正确(不能有碱基丢失、多余、突变)。

### 酶切鉴定

根据事先构建方案的设计信息,选取两个特定位点对重组质粒进行酶切,如果切断序列电泳条带谱与预期一致,说明构建成功。制定酶切方案一定要充分考虑所选酶切位点位置/个数以及切断后所产生片段的情况,不同片段大小是否可以通过电泳分开;如果选用不确定插入方向的克隆策略,通过载体酶切位点和插入序列内部酶切位点结合使用,双酶切结果分析确定核酸序列是否插入以及插入方向。

### PCR鉴定

PCR鉴定是用特异性引物扩增含目的片段的基因,比较合理的设计方案是:选取载体上的一个引物和插入序列的一个引物(下图B),扩增出的片段大小应该是载体引物到结合位点的长度加上外源片段,不可直接用外源片段上的两个引物扩增(下图C),这种方法会有很多的假阳性,因为在连接转化过程中可能会有很多的外源片段残留在待测样品中;也有研究者选用载体上跨插入位点的两个引物(下图A),这种方法对于定向克隆是完全可以的。



### 测序鉴定

基因重组克隆到载体质粒上之后,必须测序验证序列正确性,酶切鉴定和PCR鉴定只能判断片段是否插入,不能确认是否有碱基突变、碱基丢失或是碱基增加。

## 重组质粒的诱导表达

### 表达宿主菌的选择

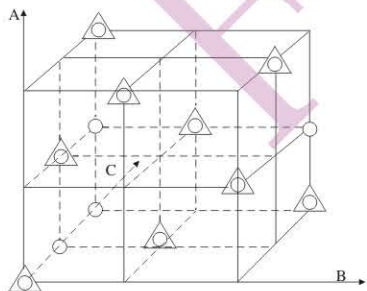
大肠杆菌常用的表达宿主菌有*E. Coli* BL21(DE3), *E. Coli* Rosetta(DE3), *E. Coli* BL21(DE3)Condon Plus。针对特殊的目标蛋白其所需要的宿主菌也不相同, 每种宿主菌的基本特征可在福因德网站 (<http://www.frdbio.com>) 查询, 福因德生物可提供表中所列菌种的感受态细胞, 如需更多信息可联系福因德技术部门。

货号	产品名称	规格	产品特点与应用
MCC0010	Frdbio® <i>E. coli</i> DH5 α 感受态细胞	100μl × 10	实验室最常用的感受态细胞, 转化效率高, 可用于蓝白斑筛选。
MCC0010S	Frdbio® <i>E. coli</i> DH5 α 超级感受态细胞	100μl × 10	主要用于文库的构建; 超高的转化效率, 可达107cfu/μg。
MCC0020	Frdbio® <i>E. coli</i> BL21(DE3) 感受态细胞	100μl × 10	λ DE3溶原菌, 带有T7 RNA聚合酶, 可用于表达T7启动子控制的的目的基因, 也可以表达大肠杆菌启动子lac、tac、trc及trp控制的基因。
MCC0030	Frdbio® <i>E. coli</i> BL21(DE3)plysS感受态细胞	100μl × 10	除了具有BL21(DE3)优势外, PlysS含有表达T7溶菌酶的基因, T7溶菌酶可以作用于大肠杆菌细胞壁上的肽聚糖溶解大肠杆菌, 能够降低目的基因的背景表达水平, 但不干扰目的蛋白的表达, 所以适合表达毒性蛋白。
MCC0050	Frdbio® <i>E. coli</i> Rosetta(DE3) 感受态细胞	100μl × 10	补充大肠杆菌缺乏的6种稀有密码子(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA)对应的tRNA, 提高外源基因, 尤其是真核基因在原核系统中的表达水平。
MCC0040	Frdbio® <i>E. coli</i> BL21(DE3) Condon Plus感受态细胞	100μl × 10	用于原核表达, 缺少Lon蛋白酶和OmpT蛋白酶, 补充大肠杆菌缺乏的4种稀有密码子(AGA, AUA, CCC, CUA); 提高富含AT-或GC-的真核基因在原核系统中的表达水平。

更多信息, 请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ [tech@friendbio.com](mailto:tech@friendbio.com)

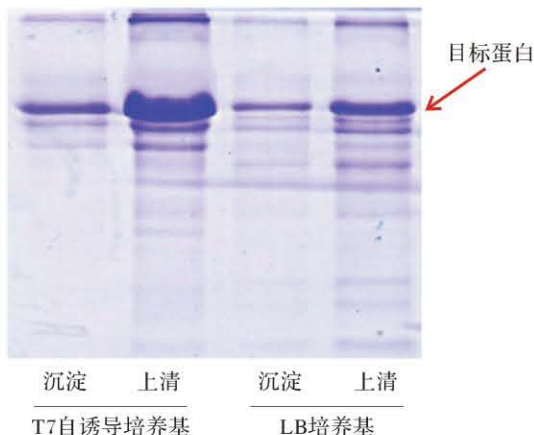
### 优化表达条件

表达条件(包括IPTG浓度、诱导温度和诱导时间等)的优化(可参照以下的正交图设计实验), 主要是为了提高蛋白产量/提高可溶性蛋白表达比例; 选用不同诱导时长主要是为了选择最佳收获时间(时间太短, 蛋白产量不够; 时间太长, 大量蛋白降解); 温度诱导主要是为了得到可溶性表达的蛋白, 很多的蛋白即使低温诱导也不能实现可溶性表达, 一定要实现可溶性表达尽可能选择促溶标签/调整IPTG浓度, 使翻译速度放缓有充分时间折叠。福因德生物技术团队研发的自诱导培养基(Frdbio T7表达自诱导培养基即用型, PER0011)就是充分利用此原理, 对表达在包涵体状态的蛋白优化为上清可溶表达状态的成功率高达60%(下图为某蛋白用T7自诱导培养基与LB培养基可溶性表达比较)。可溶性表达的策略在“蛋白可溶性表达的解决方案”章节中有详细的阐述。



A/B/C分别代表不同的维度, 每个维度代表蛋白优化表达的因素, 每个维度上设置多个水平, 每个交叉点代表正交实验的结果。  
 △ 包涵体表达 ○ 上清表达 △ 上清包涵体都表达 ✖ 没表达  
 实际实验中可以设置更多因素, 每个因素上可以设置更多水平

表达条件正交实验优化示意图



T7自诱导培养基与LB培养基可溶性表达比较



## 表达异常问题的分析处理

不表达问题排查及解决方案（不表达的原因）

### 方案设计问题

- 1.基因序列问题：**翻译起始mRNA与插入片段序列形成二级结构，外源基因序列内部有核糖体结合位点、SD序列或者其他干扰性元件。
- 2.稀有密码子问题：**可以使用相关软件分析稀有密码子问题，建议有条件的实验室进行重组蛋白表达前密码子分析优化；起始位点前15个氨基酸的密码子对表达至关重要；连续2个稀有密码子可能导致表达效率大大降低。
- 3.真核蛋白信号肽问题：**大肠杆菌缺乏加工真核蛋白信号肽的机制。
- 4.GC含量太高：**一般GC含量超过70%都是难于表达，通过基因优化降低GC含量。
- 5.分子量问题：**一般小于10kD或大于100kD的蛋白都不易表达。
- 6.标签蛋白的选择：**

在尽可能不影响目标蛋白结构的情况下，选择合适的标签，通过标签蛋白的高产量强启动表达带动目标蛋白的表达。

### 操作过程问题

质粒构建，表达工程菌使用等失误造成。

- 1.质粒构建完之后，**除了普通的酶切鉴定和PCR鉴定外，必须测序确认其无任何突变，更不能多余或者缺失碱基，确认外源片段插入后读码框与载体步调完全一致。
- 2.表达宿主菌首先必须确认标准有效，**必须与载体质粒配套，比如，我们配合pET系列载体T7启动子的表达菌是BL21(DE3)，而不是BL21，同时必须清楚知道整个体系的操作，比如，Rosetta(DE3)菌使用时必须额外添加氯霉素，否则，其额外携带的助表达质粒容易丢失；比如，含CspA启动子的载体，诱导剂不是IPTG，而是降低温度。  
**不是所有的诱导剂都是IPTG!**

### 蛋白容易降解问题

宿主菌体内的很多的蛋白酶将重组蛋白降解了，特别是N-端是Arg、Leu、Lys、Phe、Trp,或Tyr时，这就是N-末端规则；C-末端5个氨基酸是非极性氨基酸也容易被降解。这些蛋白即使表达，如果快速降解了，也很难检测到目的蛋白。

### 培养基问题

很多在LB培养基中不表达的重组蛋白，更换了TB或2×YT培养基后表达成功。

### 重组蛋白有毒性或者影响宿主菌生理功能

对于这类蛋白应考虑更为严谨的表达载体系统；比如，*E.coli* BL21(DE3) pLysS工程菌系统。

### 蛋白痕量或者表达带与宿主菌自身蛋白某高浓度带重叠

建议用标签抗体的Western Blot进行确认。

### 分子量异常问题

有些蛋白的分子量与预期有偏差，SDS-PAGE电泳是结合电荷/电场与聚丙烯酰胺凝胶孔径分析蛋白质分子量，如果蛋白质本身氨基酸组成不符合均态分布规律，会造成在SDS-PAGE胶中迁移异常，比如p53蛋白，实际分子量只有40多kD,其电泳显示为53kD,后经过分析，其序

列内部含有大量的Pro，更多的实例也表明内部富含pro的蛋白序列会造成蛋白在SDS-PAGE电泳中迁移率显示偏大。实验时需要仔细比对诱导/非诱导菌体蛋白带谱差异，结合Western Blot和纯化数据做出判断，必要时可进行质谱确认。

## 蛋白表达的确证(SDS-PAGE电泳/Western Blot)

蛋白表达与否，首先通过SDS-PAGE电泳分析比对确认，电泳时需要设置两个对照（未诱导对照和空载体诱导对照），电泳时需要保证上样的样品总蛋白量一致，蛋白上样量不宜过大（上样量过大容易造成单条带叠加或者条带异形）。阳性诱导样品与两个对照样品电泳条带比较，在预测大小附近有特异性条带，可以初步判断目的蛋白表达。如果没有，需要进一步通过标签抗体的Western Blot进行确认，福因德生物提供常见标签的抗体。关于Western Blot技术，我们将通过专题手册来为大家介绍。

## 包涵体形成原因及分析

实验者在进行蛋白表达的时候，最希望能够实现蛋白的可溶性表达；但是，大部分都是包涵体状态。主要原因是在重组蛋白的表达过程中缺乏某些蛋白质折叠的辅助因子，或环境不适，无法形成正确的次级键等原因造成的。大肠杆菌中表达的外源蛋白主要在细胞质中进行，而细胞质的环境是还原性的不利于二硫键的氧化配对。

### 常见包涵体形成原因

- 1.蛋白表达量高，合成速度快，没有足够时间给予二硫键配对或者错误配对，蛋白质溶解度差。
- 2.氨基酸组成：牵涉到二硫键配对的半胱氨酸含量越多越易形成包涵体，而脯氨酸的含量明显与包涵体的形成呈正相关。
- 3.重组蛋白产生环境：发酵温度高或胞内pH接近蛋白的等电点时容易形成包涵体。
- 4.蛋白异源性：由于缺乏真核生物中翻译后修饰所需酶类，致使中间体大量积累，容易形成包涵体沉淀。

### 包涵体对重组蛋白纯化优势

- 1.形成包涵体避免内源/外源蛋白酶降解。
- 2.迅速降低细胞质内外源蛋白含量，提高重组蛋白产量。
- 3.包涵体杂蛋白少，更利于纯化。
- 4.包涵体更利于通过超声波纯化，易与细胞膜蛋白分离。

## 蛋白可溶性表达的解决方案

### 表达工程菌纯化

蛋白可溶性表达很大原因取决于二硫键和正确折叠的问题，所以选用利于二硫键形成的宿主菌，如Origami(DE3), Origami B(DE3), Rosetta Origami(DE3) 等更利于蛋白表达。

### 使用促溶标签

前文的列表中已经详细列出，并简要介绍功能特点，值得注意的是选用促溶标签时，一定要考虑载体情况和表达工程菌的配合，如Trx标签主要是促进二硫键的配对，必须配合Origami(DE3)之类的工程菌使用，如果使用BL21(DE3)通常不会使目标蛋白的可溶性得到改善。

### 分子伴侣表达

在表达工程菌内同时装入一个表达伴侣蛋白的表达质粒，表达伴侣蛋白的质粒必须与表达外源蛋白的质粒避免“质粒不相容性”。目前，常用于大肠杆菌表达分子伴侣主要是DnaK(DnaJ, GrpE)和GroEL(GroES)等，实验者可根据实验需要构建合适的分子伴侣质粒，含分子伴侣质粒的感受态细胞已经有商业化的产品BL21(pG-KJE8、pGro7、pKJE7、pG-Tf2、pTf16)系列，实验者可以根据具体情况选购。

### 选择合适的启动子

载体的启动子对于可溶性表达至关重要，pET系列的T7/T7 lac为强启动子，强启动子在提高蛋白产量的同时也增强了包涵体的形成，如果遇到此种情况可以考虑换用弱启动子的载体，如pGEX系列，还可选择含cspA启动子的pCold系列载体。

### 分泌性表达

将外源目标蛋白分泌表达达到培养基中，实现这个功能需要将原核蛋白信号肽序列加到外源蛋白的上游即可；目前，福因德生物已经开发出pFRD-peIB系列载体，可以帮助实现在大肠杆菌中分泌表达。

### 培养条件的优化

最常用的优化条件为：诱导温度、诱导剂浓度和诱导时间；还可以优化培养基的营养成分和离子物质，比如，我们使用营养成分稍低的LB培养基，可同时向培养基中添加葡萄糖，镁离子、氯化钠、硫酸铵等盐离子。

- 1.低温诱导:比如20℃,低温情况下,转录和翻译变慢,蛋白质浓度低,有更多的时间正确折叠;
- 2.向培养基中加入0.4M蔗糖,高渗引起了渗透性休克反应,该反应增加了细胞内谷氨酸、脯氨酸和海藻糖的水平,为蛋白的正确折叠提供了环境;
- 3.42℃短暂热休克,然后降温到20℃:热休克增加了DnaK/J和GroEL/ES的水平,通常的程序是37℃培养到 $A_{600nm}=0.5$ ,然后快速升温到42℃维持15min左右,然后降到20℃并诱导蛋白的表达。
- 4.自诱导培养基,适合于T7启动子系列的诱导表达,当工程菌增长到一定密度后,自己缓慢开启诱导开关,缓慢诱导蛋白表达,利于蛋白正确折叠,便于可溶性表达。

货号	产品名称	规格	产品描述
PER0011	Frdbio® T7自诱导培养基	500ml	T7启动子原核表达自诱导表达,优化可溶性表达。
PER0011S	Frdbio® 50×T7自诱导培养基添加剂	100ml	T7启动子原核表达自诱导表达,优化可溶性表达。
PER0021	Frdbio® pG-KJE3伴侣蛋白质粒	50ng	协助蛋白正确折叠,优化可溶性表达。
PER0022	Frdbio® pGro7伴侣蛋白质粒	50ng	协助蛋白正确折叠,优化可溶性表达。
PER0023	Frdbio® pKJE7伴侣蛋白质粒	50ng	协助蛋白正确折叠,优化可溶性表达。
PER0024	Frdbio® pG-Tf2伴侣蛋白质粒	50ng	协助蛋白正确折叠,优化可溶性表达。
PER0025	Frdbio® pTf16伴侣蛋白质粒	50ng	协助蛋白正确折叠,优化可溶性表达。
PEV0031	Frdbio® pFRD-peIB质粒	50ng	原核分泌型表达载体

服务编号	服务名称	服务描述
PES0030	大肠杆菌重组蛋白表达	从客户提供的材料信息开始进行重组蛋白原核表达。
PES0031	大肠杆菌重组蛋白可溶性表达	从客户提供的材料信息开始进行重组蛋白原核上清可溶性表达。

更多信息,请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

### 上清可溶性表达重组蛋白的纯化

重组蛋白以上清可溶性状态表达,细菌破碎裂解以后可以通过其融合标签进行特异性纯化,目前常用的标签纯化方法有6His标签亲和纯化,GST标签亲和纯化(谷胱甘肽),MBP标签亲和纯化和Strep II标签蛋白亲和纯化等,这些纯化方法都已经非常成熟,福因德生物针对不同实验需求开发出不同产品,实验者可参照操作说明进行。需要强调的是,由于蛋白质自身理化性质不同,因此在纯化过程中所遇到的问题也不尽相同,最为突出的问题就是标签蛋白不挂柱(或不易洗脱)和纯化蛋白杂带多;并不是按照标准说明就可以得到高纯蛋白的;遇

到这些问题除了求助于厂家的技术支持外,还需要:

- 1.仔细排除实验中操作失误以及不合格试剂带来的影响。
- 2.在此基础上进一步优化纯化条件,比如,纯化蛋白杂带多,可以尝试不同条件和不同洗脱浓度的梯度洗脱,收集不同的组分以找到最优的纯化条件,具体内容可参照后文中“His和GST标签蛋白纯化问题分析与解决”内容。
- 3.尝试不同的纯化介质,比如:如果Ni-NTA纯化杂带太多可以尝试Co-NTA或Zn-NTA。

**SOP05 Ni-NTA层析柱亲和纯化6His标签融合蛋白(可溶表达)**

**1. 样品制备**

**样品制备1: 细菌或酵母胞内表达的蛋白**

(1) 将诱导表达结束后的培养物转移到离心管中, 8,000rpm, 离心15min收集菌体, 然后加入1/10体积的裂解缓冲液(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0, 1mM PMSF), 加入0.2~0.4mg/ml溶菌酶。

PMSF很容易降解,在破菌前加入,同时还可加入不影响目的蛋白与树脂结合的蛋白酶抑制剂。

(2) 将菌体沉淀悬浮起来, (如果菌液浓度高,也可考虑加入10μg/ml RNase A和5μg/ml DNase I), 混匀, 放置于冰上, 然后冰上超声破碎细胞, 至菌液基本保持澄清。

(3) 将澄清的破碎液转移至离心管中, 10,000rpm下, 4℃离心20~30min, 取上清, 置于冰上备用或-20℃保存。

**样品制备2: 酵母、昆虫和哺乳细胞分泌表达可溶性蛋白**

将诱导表达结束的培养物转移到离心管中, 8,000rpm, 离心15min, 收集上清。

如上清中不含EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 即可直接上柱使用;

如含有EDTA、组氨酸和还原剂等物质, 需先用PBS 4℃下透析才可上柱;

大量体积的上清, 需加入(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>沉淀浓缩, 再用PBS 4℃透析后再上柱子。

**2. 样品纯化**

Ni-NTA亲和树脂灌装层析柱或直接使用预装柱, 层析柱下端接核酸蛋白检测仪。

所有溶液/样品液使用前建议离心或用0.22μm或0.45μm滤膜过滤后再上柱。

(1) 用3~5倍柱床体积的去离子水冲洗掉层析柱树脂保护液。

(2) 使用至少5倍柱床体积的裂解缓冲液平衡层析柱。

(3) 经过滤的样品液上柱, 并收集层析柱下端流出的液体(流穿液)。

利用泵或注射器上样, 如果是重力柱也可直接用移液器上样。

(4) 用洗杂缓冲液(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) 冲洗柱子, 直到核酸蛋白检测仪数值达到一个稳定的基线; 至少需要10~15倍柱床体积洗杂缓冲液。

在裂解缓冲液和洗杂缓冲液中加入低浓度咪唑(imidazole)可以提高纯化蛋白的纯度。

(5) 用洗脱液(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) 采用一步法或线性梯度洗脱液(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20~300 mM imidazole, pH 8.0) 梯度洗脱。洗脱的过程中顺次分管接收洗脱蛋白并分别做上标记。

一步法洗脱中, 通常5倍柱床体积洗脱液可彻底洗脱。

梯度洗脱中, 通常需要20倍柱床体积或更多洗脱液分离不同结合强度的蛋白质。

**3. SDS-PAGE检测分析纯化过程各组分。**

纯化过程中得到的样品(包括上样前样品液、流穿液、洗杂液和顺次收集的洗脱蛋白)以及原始样品使用SDS-PAGE检测分析纯化效果。

**4. 填料再生与保存**

组氨酸标签蛋白亲和和纯化填料所带的Ni<sup>2+</sup>不需要经常螯合去除和重新挂Ni<sup>2+</sup>。当填料使用过程中发现反压过高, 填料上面出现明显的污染, 或者填料载量明显变低时, 需要进行对填料进行Ni<sup>2+</sup>剥离和重新挂Ni<sup>2+</sup>, 也就是填料再生。将填料装填在合适的层析柱内, 按照下面操作流程进行Ni<sup>2+</sup>剥离和重新挂Ni<sup>2+</sup>。

(1) 使用0.2 M 醋酸溶液(含6 M 盐酸胍)清洗2倍柱床体积。

(2) 使用去离子水清洗5倍柱床体积。

(3) 使用2% SDS 清洗3倍柱床体积。

(4) 使用去离子水清洗5倍柱床体积。

(5) 使用乙醇清洗5倍柱床体积。

(6) 使用去离子水清洗5倍柱床体积。

(7) 使用100 mM EDTA (pH 8.0)清洗5倍柱床体积。

(8) 使用去离子水清洗5倍柱床体积。

(9) 使用100 mM NiSO<sub>4</sub>清洗5倍柱床体积。

(10) 使用去离子水清洗10倍柱床体积。

填料再生后, 可以立即使用, 也可以保存在20%的乙醇中, 置于4℃保存。

**Tips: 填料上残留污染物的去除**

建议按照下面操作去除填料上残留的污染物, 如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

**去除强疏水结合的蛋白、脂蛋白和脂类**

通过使用30%异丙醇清洗5~10倍柱床体积, 接触时间为15~20min可以去除此类污染物。然后, 再使用10倍柱床体积的去离子水清洗。也可以选择使用含有去污剂的酸性或碱性溶液, 2倍柱床体积清洗填料。例如, 含有0.1~0.5% 非离子去污剂的0.1 M 醋酸溶液, 接触时间为1~2 h。去污剂处理后, 需要使用70%的乙醇清洗5倍柱床体积, 以彻底去除去污剂。最后使用10倍柱床体积的去离子水清洗。

**去除离子作用结合的蛋白**

使用1.5M NaCl溶液浸泡柱床填料10~15min后, 流出浸泡液, 再使用去离子水清洗10倍柱床体积。

问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	上样品中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22或0.45 μm）过滤，或者离心去除。
	样品太粘稠	样品中含有高浓度的核酸，加长破碎时间直至粘度降低，或者添加DNase I（终浓度5 μg/ml），Mg <sup>2+</sup> （终浓度1 mM），冰上孵育10–15min。
洗脱组分中没有目的蛋白	蛋白可能是包涵体，没有在上清中	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白，包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式。
	表达量太低	优化表达条件，提高表达量。
	目的蛋白结合比较弱，在洗杂步骤被洗下来了	提高洗杂缓冲液的pH，或者降低咪唑浓度。
	目的蛋白结合过强，不容易洗脱下来	降低洗脱缓冲液的pH值，或者增加洗脱缓冲液中咪唑浓度。
	蛋白降解	使用10~100mM EDTA溶液剥离镍离子，同时得到目的蛋白。
洗脱组分不纯(含有多种蛋白)	洗杂不彻底	菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。在4℃下进行纯化操作。
	样品中含有其他蛋白	增加洗杂缓冲液体积。
填料呈现褐色	缓冲液中含有DTT等还原剂	通过调节pH值，或者咪唑浓度来优化洗杂条件。再使用其他的纯化手段（如离子交换，疏水等）进一步纯化洗脱组分。
上样过程中蛋白发生沉淀	操作温度太低	适当降低还原剂DTT的浓度，或者改用巯基乙醇。
	蛋白发生聚集	室温下进行上样。
		在样品和所有的缓冲液中添加稳定剂，如0.1%的Triton X-100 或者Tween-20。

**SOP06 谷胱甘肽亲和柱纯化谷胱甘肽还原酶（GST）标签融合蛋白**

**1. 样品制备**

与“SOP05 Ni-NTA层析柱亲和纯化6His标签融合蛋白”中样品制备方法相同，裂解缓冲液（50mM Tris, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% Triton X-100, 0.5mM DTT, 1mM PMSF, 1mM NaF, protease inhibitors cocktail, pH7.5）。

**PMSF, DTT, protease inhibitors cocktail在破菌前加入。**

适合于GST Pull-Down的细菌裂解液配方还有很多，可以参考福因德生物网站(www.frdbio.com)。

**2. 样品纯化**

Glutathione Beads亲和树脂灌装层析柱或直接使用Glutathione Beads预装柱，层析柱下端接核酸蛋白检测仪。

(1)平衡层析柱至工作温度，纯化过程可在室温或4℃进行。

(2)将层析柱固定在支架上，让其流尽树脂保护液，快流干的时候用至少5倍体积的平衡/洗涤缓冲液（50mM Tris, 150mM NaCl, pH8.0)冲洗柱子。

(3)制备的蛋白样品与平衡/洗涤缓冲液1:1混合，加到平衡好的Glutathione Beads中（保证目的蛋白与Glutathione Beads充分接触，提高目的蛋白的回收率），收集流穿液。

(4)用10~15倍柱床体积的平衡/洗涤缓冲液清洗柱床，去

除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗涤液。

(5)使用5~10倍柱床体积的洗脱缓冲液（50mM Tris, 150mM NaCl, 10mM还原型谷胱甘肽, pH8.0），收集洗脱液，即目的蛋白组分。还原型Glutathione易氧化，也容易影响pH,需用现配,同时注意调pH 8.0。

**3. SDS-PAGE检测分析纯化过程各组分**

纯化过程中得到的样品（包括上样前样品液、流穿液、洗杂液和顺次收集的洗脱蛋白）以及原始样品使用SDS-PAGE检测分析纯化效果。

**4. 填料再生与保存**

依次使用3倍柱床体积的平衡/洗涤缓冲液和5倍柱床体积的ddH<sub>2</sub>O平衡柱床，最后再用5倍柱床体积的20%的乙醇平衡，然后保存在等体积的20%的乙醇中，置于4℃保存。

**5. 填料清洗**

GST标签蛋白纯化产品可以重复使用而无需再生，但随着非特异性结合的蛋白的增多和蛋白的聚集，往往造成流速和结合载量都下降，这时需要对树脂进行清洗。

**去除一些沉淀或变性物质**

用2倍柱床体积的6M盐酸胍溶液进行清洗，然后立即用5倍柱床体积的PBS(pH 7.4)清洗。

**去除一些疏水性吸附造成的非特异性吸附物质**

用3~4倍柱床体积的70%乙醇或2倍柱床体积的1% Triton X-100清洗，然后立即用5倍柱床体积的PBS(pH 7.4)清洗。

问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	按照“5.填料清洗”部分进行树脂清洗。 裂解缓冲液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜(0.22或0.45 μm)过滤，或者离心去除。
	样品太粘稠	样品中含有高浓度的核酸，加长破碎时间直至粘度降低，或者添加DNase I (终浓度5 μg/ml)，Mg <sup>2+</sup> (终浓度为1 mM)，冰上孵育10~15min。
	缓冲液太粘稠	有机溶剂或者蛋白稳定剂(如甘油等)可能会引起反压增高，降低操作流速。
洗脱组分中没有目的蛋白	GST标签蛋白变性了	使用温和的裂解条件，进行多种条件摸索。
	过度的裂解使目的蛋白变性	
	目的蛋白聚集产生了沉淀	在细胞裂解前溶液中加入DTT，终浓度为1~20 mM。
	细菌裂解不充分，蛋白没有释放出来	优化裂解条件。
	表达蛋白包涵体过多	优化诱导表达条件使其尽可能在上清表达。
	融合蛋白改变了GST的构象，影响了目的蛋白的结合力	如果空载体中GST有很高的亲和力，有可能改变融合蛋白的构象从而降低了GST标签蛋白的亲和力。裂解液中加入5mM DTT可以改善结合效果。 降低结合温度至4℃，充分地清洗。
目的蛋白没有完全洗脱下来	柱子平衡时间太短，目的蛋白不是在pH6.5~pH8.0范围内结合的	用pH 6.5~pH 8.0的Buffer进行充分的平衡(PBS)。
	洗脱体积太少	增加洗脱液体积，减小洗脱流速。
	洗脱液中谷胱甘肽浓度太低	增加洗脱液中谷胱甘肽浓度，可尝试用50 mM Tris-HCl, 20~40 mM还原型谷胱甘肽, pH 8.0洗脱。
	低pH影响洗脱	在不增加洗脱液中的谷胱甘肽量时，提高洗脱液中pH至pH 8~9会有改善。 增加洗脱液中离子强度，如0.1~0.2 M NaCl。
	洗脱液中的谷胱甘肽被氧化	使用新鲜配制的洗脱液 加入 DTT。
	非特异性疏水作用影响目的蛋白的溶解与洗脱	洗脱液中加入非离子型洗涤剂，如0.1%的Triton X-100 或者2%正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷Tween-20。
电泳或Western Blot 检测中发现多条带	分子量70kD蛋白与目的蛋白一起被纯化出来	分子量70kD的蛋白有可能是大肠杆菌基因DnaK的产物，可以通过在目的蛋白中加入(50 mM Tris-HCl, 2 mM ATP, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7.4)在37℃加热10 min去除。 可以通过ATP-琼脂糖胶或离子交换来去除目的蛋白溶液中的DnaK蛋白。
	GST融合蛋白已经发生降解	在裂解液中加入蛋白酶抑制剂，如加入1 mM PMSF。 有可能是蛋白酶对目的蛋白部分降解造成的，可以使用蛋白酶缺陷型宿主菌(如lon-或ompT)。
	细胞破碎过度	减少细胞破碎时间，超声前加入溶菌酶(菌液体积的0.1倍的10 mg/ml溶菌酶，25 mM Tris-HCl, pH 8.0)，避免发泡导致蛋白变性，过度超声破碎增加宿主内源蛋白与GST融合目的蛋白的共纯化。
	上柱后洗涤不充分	增加样品纯化环节第(3)步平衡/洗涤缓冲液清洗柱床时间。
	共价共纯化	包括促进蛋白正确折叠的分子伴侣的共纯化，如：DnaK (Mr ~ 70 kD)，DnaJ (Mr ~ 37kD)，GrpE (Mr ~ 40 kD)，GroEL (Mr ~ 57kD) 和 GroES (Mr ~ 10kD)。可尝试再次纯化改善。
	目的蛋白与其他蛋白非特异性结合	在裂解液加入5mM DTT降低非特异性结合。

标签纯化类型	产品名称	产品特点
6His标签蛋白纯化	Frdbio® Ni IDA Beads	具有蛋白载量高，性价比高等优点。
	Frdbio® Ni NTA Beads	性能稳定，可以耐受一定浓度的还原剂、变性剂或耦合剂等苛刻条件。
	Frdbio® Ni NTA kit	Ni-NTA预装柱，使用更方便。
	Frdbio® Ni Super beads	新型的金属离子螯合填料，可以耐受非常苛刻的实验条件。镍离子脱落率低。咪唑使用浓度低。选择特异性高。
GST标签蛋白纯化	Frdbio® Glutathione Beads	树脂载量大于20mg GST融合蛋白。Glutathione Beads具有载量高、特异性好、性价比高的特点。
	Frdbio® Glutathione Kit	Glutathione Beads预装柱，使用更方便。
MBP标签蛋白纯化	Frdbio® Dextrin Beads	带有麦芽糖结合蛋白(MBP)标签蛋白的亲亲和层析介质，可以用10mM麦芽糖进行温和洗脱。
	Frdbio® Dextrin Beads kit	Dextrin Beads预装柱，使用更方便。
Strep II 标签蛋白	Frdbio® Strep-Tactin Beads	Strep II标签为8个氨基酸的小标签(WSHPQFEK)。
	Frdbio® Strep-Tactin Beads kit	Strep-Tactin Beads预装柱，使用更方便。

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

## 蛋白标签的切除

融合标签的切割需要根据不同载体上设计的标签蛋白与目标蛋白之间的蛋白酶切位点选择合适的蛋白酶，福因德生物可以提供优质的蛋白酶。蛋白酶切需要注意的是目标蛋白内部不能有相同的蛋白酶切位点，酶切条件需要反复摸索，有些重组蛋白经蛋白酶切以后，由于理化性质发生了变化，有可能导致蛋白失活、发生沉淀或加速降解。

### SOP07 GST融合蛋白标签柱上酶切

**缓冲液A**（平衡缓冲液）：10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>， 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>， 140mM NaCl， 2.7mM KCl， pH 8.0。

**缓冲液B**（洗脱缓冲液）：10mM Glutathione（还原型）， 50mM Tris-HCl， pH 8.0（还原型Glutathione易氧化，也容易影响pH，需用现配，同时注意调pH 8.0）。

注：各种溶液配制完毕后，最好进行脱气处理，0.45μm滤膜过滤备用。

- 1.裂解菌体，离心后收集上清作为上样样品。
- 2.用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头，确保柱底筛板上无气泡，关闭柱底出口，并在柱底部留出1~2cm的去离子水。
- 3.将GST亲和树脂悬浮，取2ml加入层析柱中。
- 4.用5倍柱床体积的缓冲液A进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用。
- 5.取上清加入层析柱，室温孵育1h后，收集流出液，留

样待检。

6.用5倍柱床体积的缓冲液A进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液，留样待检。

7.向层析柱中添加100μl HRV 3C酶（根据产品说明添加建议2~3U/100μg底物），并添加适量体积的缓冲液A，室温下进行柱上酶切~3h。

8.分别收集流穿和3倍柱床体积缓冲液B清洗的洗脱产物，SDS-PAGE分析结果。

9.取上一步骤得到的流穿于新的GST亲和树脂再次进行GST亲和层析，收集流穿，即为酶切后的目的蛋白组分。

10.将纯化过程中得到的样品（包括流穿组分、洗杂组分和洗脱组分等）以及原始样品使用SDS-PAGE检测纯化及酶切效果。

货号	蛋白酶名称	切割位点	Frdbio相关产品
PEP0031	Frdbio® TEV protease	Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln▼Gly	Frdbio® TEV protease
PEP0032	Frdbio® PreScission® (HRV 3C Protease)	Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln▼Gly-Pro	Frdbio® 3C Protease
PEP0033	Frdbio® SUMO标签切割酶	recognize the tertiary structure of the ubiquitin-like (UBL) protein, SUMO	Frdbio® ULP蛋白酶

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773； ✉ tech@friendbio.com

## 包涵体纯化与复性(蛋白重折叠)

### 包涵体蛋白洗涤

包涵体的洗涤主要是洗掉尽可能多的细菌蛋白组分、DNA及细胞膜成分。常用2%脱氧胆酸钠（Sodium Deoxycholate）或1% Triton X-100洗涤，后者比前者更好，但是要选用高纯度的试剂，不纯的试剂含有大量的氧化剂影响，也可以选择低浓度的变性剂，如1~2M的尿素进行尝试，究竟哪种盐或者变性剂效果更好，需要实验者去做比较尝试。

### 包涵体的溶解

对于接近天然状态的包涵体蛋白，用非离子去污剂或盐溶液（如0.5M NaCl）就可以将其溶解，但是，大部分的包涵体需要通过促溶变性剂才可以溶解，促溶变性剂需要溶解在裂解缓冲液里面，以维持稳定的溶液环境，溶解温度一般在室温进行即可，溶解时间为60min左右，必要时可以适当加温或者通过超声波助溶。

### 常用的促溶变性剂

**1.盐酸胍** 比较强的变性剂，通常的使用浓度为6M,一旦蛋白质完全溶解，将其浓度降低到3M时也不会轻易发生沉淀，在浓度为1~2M时，部分蛋白质开始复性，如果复性后的蛋白想要通过离子交换进行纯化，其盐酸胍浓度必须降低到0.1M以下。

**2.尿素** 尿素的通常使用浓度为8M，尿素的促溶和变性效果不如盐酸胍，并且尿素中含有氰酸盐，会造成蛋白的氨甲基化，氨甲基化导致蛋白功能、理化性质发生变化。因为氰酸盐在尿素中的产生是一个动态的平衡，无法根除，所以为了避免氰酸盐对蛋白质的影响，可以使用适当的清除剂将其浓度适当降低来减少其对蛋白纯化的影响，福因德生物可以提供尿素氰酸盐去除试剂。

**3.十二烷基肌氨酸钠 (SKL)或十二烷基磺酸钠 (SDS)** 十二烷基肌氨酸钠是一种强阴离子变性剂，可以帮助包涵体蛋白在高浓度下重新折叠，通常使用浓度为0.3%，其溶解包涵体蛋白的总质量不超过自身质量。SDS与SKL相比，其结合力更强，不容易解离，实验者更愿意使用后者。

货号	产品名称	规格	产品描述
PEP0020	Frdbio® cyanate Removal Reagent Frdbio尿素氰酸盐去除试剂	100ml/200ml	降低尿素中氰酸盐对蛋白氨甲基化影响。

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

### 包涵体复性的条件筛选

重折叠主要影响因素：

**PH值：**5~9(pH8~8.5效率最佳)。

**温度：**一般在室温情况下进行就可以，温度太高容易造成蛋白的热损伤。

**盐浓度：**一般适用50~100mM的盐浓度来增加蛋白质的溶解度。

**氧化还原剂：**氧化还原剂一般是辅助二硫键的形成,常用的氧化还原组合有还原型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽,二硫苏糖醇和氧化型谷胱甘肽。

**二价阳离子：**许多蛋白都含有二价阳离子作为其结构的一部分,比如Mg<sup>2+</sup>,Zn<sup>2+</sup>。

**精氨酸和其他辅助氨基酸：**精氨酸可以减弱蛋白之间的聚集作用，给予蛋白充分的时间正确折叠。

**甘油和糖类：**甘油是很好的蛋白质折叠添加剂，通常使用浓度为5%~30%，很多的糖类（如蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇和海藻糖）等也可以促进蛋白质的折叠，最佳使用浓度为0.5~1.5M。

**其他的化学添加剂：**聚乙二醇、环糊精、甜菜碱等。

**去污剂：**十二烷基肌氨酸钠，在高浓度下促使蛋白变性，低浓度下作为分子伴侣阻止重新聚集，促进折叠。

**变性剂：**低浓度的变性剂（如1M尿素和0.5M盐酸胍）对解离聚集体稳定天然结构是有帮助的。

如此繁多的影响因素，实在不知道如何下手，福因德生物经过潜心研究，开发出包涵体蛋白重折叠试剂盒，可以通过微孔板快速微量筛选实验找到您的包涵体最佳复性折叠条件，省去您大量摸索的过程。

货号	产品名称	规格	产品描述
PEP0010K	Frdbio® inclusion body Refolding Kit Frdbio包涵体重折叠试剂盒	15 solution/30 solution/96solution	快速筛选出包涵体最优溶解条件

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com



### 蛋白质复性（重折叠）常用方法

最为常用的就是稀释法和透析法，稀释法又包括反向稀释、瞬时稀释和滴注稀释，透析法置换缓冲液比较缓慢，不论使用何种方法，最终都要尽可能控制蛋白质浓度，避免聚集。

**1.柱上折叠：**不论是离子交换柱还是分子筛色谱柱，因变性蛋白吸附在离子交换树脂表面或分布在分子筛色谱柱的孔道内，所以不会聚集，在变性剂浓度逐渐降低的情况下发生重折叠。

**2.使用分子伴侣或者酶催化剂：**常用的酶有脯氨酸异构酶和二硫键异构酶，催化二硫键的有DsbA和DsbB,促进折叠的有分子伴侣有GroEL/GroES。

**3.碱性pH条件溶解和重折叠：**有研究表明，包涵体中的部分蛋白是正确折叠的，在碱性条件下可以很好的溶解于低浓度变性剂，其中有很大一部分有蛋白活性。

### 复性蛋白（重折叠）的纯化

一般采用高分辨率的离子交换柱进行纯化，纯化的过程中可以浓缩蛋白，去除变性剂、杂质、可溶性非正确折叠和可溶性蛋白质多聚体，如果想要去除内毒素，可在洗脱前用异丙醇清洗柱子。

### 复性蛋白的鉴定

复性蛋白的鉴定需要天然状态下该蛋白的活性参考数据。可行性的实验方法可以定量分析；如果想要确定活性蛋白的纯度还必须要有完整活性的标准品用于比较。

#### SOP08 包涵体蛋白纯化

##### 1.包涵体蛋白的获取

(1)从半固体培养基平板上挑取一个表达菌单集落，加入2ml含有相应抗生素的LB培养基37℃培养活化过夜；次日，2L培养瓶加入1L含相应抗生素LB培养基，接种1ml活化好的表达菌37℃振荡条件下培养至 $A_{600nm}=0.6$ 。

(2)加入异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至0.5~1mM，诱导目的蛋白表达。

(3)诱导3~4h后，15,000 rpm离心15 min收获菌体细胞，用小体积的培养上清液重悬细胞，然后将其转移至预先称重的50 ml离心管中，离心沉淀细胞。记录细胞沉淀的湿重，并冻存于-80℃备用。

此方法一般每升可得到1.5~2.0g湿重的大肠杆菌细胞。

(4)裂解细胞，用30 ml裂解缓冲液[50 mM Tris-HCl (pH7.9), 0.1mM EDTA,5%甘油, 0.1mM DTT,0.1M NaCl]悬浮细胞，超声波破碎细胞至清亮（冰上操作，60%功率4次，每次20秒，间隔1min）。

(5)加入纯Triton X-100至终浓度为1%，吹打或者轻度超声以溶解和洗涤细胞膜蛋白；裂解物于冰上静置10min，然后15,000rpm离心15min沉淀包涵体，弃上清。

(6)加入30ml含1% Triton X-100的裂解缓冲液洗涤包涵体，吹打或者轻度超声，冰上静置10min，然后15,000rpm离心15min沉淀包涵体，弃上清。

(7)加入30ml裂解缓冲液洗涤包涵体，吹打或者轻度超声，冰上静置10min，然后15,000rpm离心15min沉淀包涵体，弃上清。此时，包涵体纯度达到90%左右。

##### 2.包涵体蛋白的溶解

(8)将洗涤后的包涵体重悬于合适的变性缓冲液(裂解缓冲液中加入合适的变性剂),使其变性和溶解;变性之后15,000rpm离心15min去除残余不溶物。

注：通常使用的变性缓冲液以裂解缓冲液为基础溶液，加入6M盐酸胍，8M尿素或者0.3%十二烷基肌氨酸钠等，变性和溶解的时间根据包涵体的性质确定，上文已经提及。

##### 3.包涵体蛋白的复性

(9)将变性的包涵体蛋白浓度调整到1mg/ml。

(10)将包涵体蛋白滴加到快速搅拌的重折叠缓冲液中使其复性，滴加的第(9)步骤包涵体溶液的体积不超过溶液总体积的1/15。滴加完之后，静置2h以上。

##### 4.包涵体的纯化

(11)步骤(10)的包涵体溶液15,000rpm离心15min弃除不溶物，或者低吸附0.22um过滤器过滤。包涵体的纯化可以选用合适的离子交换柱进行，上柱尽可能快速，如果选用15ml柱子，复性蛋白上柱速度至少在10ml/min,必要时使用蠕动泵。

(12)用5~10倍体积的洗涤缓冲液(0.1M NaCl,50mM Tris-HCl, 5%甘油, 0.1mM EDTA,0.1mM DTT ,pH7.9,)冲洗柱子，之后用10倍体积的洗脱缓冲液[整个过程中，匀速将上述洗涤缓冲液中NaCl浓度从0.1M逐渐升到1M]，梯度洗脱流速为5ml/min,每3ml左右收集一管。整个过程中检测280nm吸光值，如果有条件同时检测320nm吸光值。320nm吸光值可能为多聚体

##### 5.包涵体蛋白的鉴定与保存

(13) SDS-PAGE分析各个收集管的蛋白纯度；

如果能够做酶活性分析的，对收集的各个组分做酶活性分析，如果有该蛋白标准品，可以通过标准酶活作酶活定量分析。

(14)蛋白样品保存：包涵体蛋白用含50%甘油的裂解缓冲液，-20℃或-80℃分装成小管保存。

**SOP09 Ni-NTA层析柱亲和和纯化6His标签融合蛋白(包涵体表达)**

**1.样品制备：包涵体蛋白样品**

(1)将诱导表达结束后的培养物转移到离心管中，8,000rpm，离心15min收集菌体，然后加入1/10体积的裂解缓冲液(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,300 mM NaCl,10mM imidazole ,pH 8.0,1mM PMSF),加入0.2~0.4mg/ml溶菌酶。

PMSF很容易降解,在破菌前加入,同时还可加入不影响目的蛋白与树脂结合的蛋白酶抑制剂。

(2)将菌体沉淀悬浮起来(如果菌液浓度高,也可考虑加入10μg/ml RNase A和5μg/ml DNase I),混匀,放置于冰上,然后冰上超声破碎细胞。

(3)将破碎液转移至离心管中,10,000rpm,4℃离心20~30min,去掉上清,沉淀为包涵体。

(4)步骤(2)和(3)可以重复一次。

(5)按照原菌体质量:包涵体溶解缓冲液(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,300mM NaCl,10mM imidazole,8M尿素,pH8.0)=1:10(W/V)将包涵体悬浮溶解,此为包涵体溶液。

包涵体溶液可用于变性条件下His标签蛋白的纯化。

**2.样品纯化**

纯化方法与“上清可溶性表达重组蛋白的纯化”章节“SOP05 His标签融合蛋白Ni-NTA的纯化”方法完全相同,不同点在于纯化过程所有溶液都在上述实验基础上都添加8M尿素。

货号	产品名称	规格	产品用途
TAG0010	Frdbio® Mouse anti- His Tag mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB IF IP
TAG0020	Frdbio® Mouse anti- GST Tag mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB IF IP
TAG0030	Frdbio® Mouse anti- HA Tag mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB IF IP
TAG0040	Frdbio® Mouse anti- Myc Tag mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB IF IP
TAG0050	Frdbio® Mouse anti-DDDDKTag(Flag) mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB IF IP IHC
TAG0060	Frdbio® Mouse anti-MBP Tag mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB IP
TAG0070	Frdbio® Mouse anti-GFP Tag mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB IP
TAG0080	Frdbio® Mouse anti-mCherry Tag mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB IP
TAG0090	Frdbio® Mouse anti-RFP Tag mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB IP
TAG0120	Frdbio® Mouse anti-V5 Tag mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB IF IP
TAG0130	Frdbio® Mouse anti-Trx Tag mAB	0.1ml/0.5ml/1ml	WB

更多信息,请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com



T7自诱导培养基



包涵体复性试剂盒



蛋白纯化亲和填料



荧光定量PCR Mix



TEV蛋白酶



Simpleclone重组酶



HRV 3C蛋白酶